

キトサンビーズの作製と酵素固定化

桜井謙資* 北田和之* 高橋利禎*

Preparation of Porous Chitosan Beads as Supports for Immobilization of β -Galactosidase

Kensuke SAKURAI^{*}, Kazuyuki KITADA^{*}
and Toshisada TAKAHASHI^{*}

(Received Jul. 20, 1989)

Chitosan has been noticed as "the final biomass", which is one of polysaccharides and is wealthy in the reactivity because of the amino groups in the molecule. Here, we prepared four kinds of chitosan beads using the different chitosan dopes and coagulants. The porous beads gave the network structure on the surface and the porous sponge structure inside. The immobilized β -galactosidase was prepared by incubating a mixture of 340 units of enzyme and 1g (wet) of porous chitosan beads with 1% glutaraldehyde at pH5 and 25°C for 1 hr. It showed the maximum activity at pH4.6 and 55°C and the thermostability was slightly improved from 55°C to 60°C. When the immobilized enzyme was used repeatedly over 8 times under the condition of pH4.6, 40°C and 10 min, the activity was kept in the constant value without the reduction. These facts show that the porous chitosan beads are useful as supports for the immobilization of enzyme.

* 材料化学科

1. 緒 言

キトサンは分子内にアミノ基を持つセルロース類似の多糖類で化学反応性に富み、酢酸等の有機酸水溶液に容易に溶解し、繊維、フィルム、ビーズ、ゲル等の成形加工が可能な生体高分子材料であり、多くの研究者により広く研究されている[1-9]。我々はこれまでに湿式紡糸や液晶紡糸により繊維を作製しその繊維特性について、また、各種条件下で製膜を試みその膜特性等について検討してきた[10-18]。ここでは、キトサンの多孔性ビーズの調製法とビーズ構造の検討と、酵素(β ガラクトシダーゼ)の固定化担体として性能(酵素固定化量、活性収率など)について検討した。

2. 実 験

2.1 ビーズの調製

市販キトサン(東京化成、脱アセチル化度約75%、重合度約4500)を5%過硼酸ソーダ水溶液中で55℃、30分間加温処理して低重合度(60)キトサンを準備する。1.5wt%酢酸水溶液に低重合度キトサンを溶かして7wt%キトサン溶液(ドープ)を準備した。また、この溶液に添加剤として分子量1000のポリエチレングリコール(PEG1000)をキトサンの2倍量(200phr)同時に溶し込んだドープも準備した。一方、メタノール5%、水酸化ナトリウム2%、蒸留水93%の混合液を凝固液とした。注射器を用いて凝固液中にドープを滴下してビーズを作った。ビーズは十分水洗した後水中に保存した。この膨潤したビーズは自重の約8倍の水を含んでいた。

2.2 β ガラクトシダーゼの固定化

キトサンビーズへの β ガラクトシダーゼの固定化は、池田らの固定化法[19]に準じて架橋剤にグルタルアルデヒドを用い、キトサンと酵素タンパクのアミノ基間に Schiff 塩基を形成する担体結合法で行った。固定化反応を図1に示す。

水膨潤状態のキトサンビーズ1g(wet)を25mlの蒸留水中に入れ、25%グルタルアルデヒド水溶液を1ml加え、25℃で1時間攪拌下で反応する。(第1段) このビーズを蒸留水で十分水洗した後、10mlの0.1M酢酸緩衝液(pH5)に入れ、 β ガラクトシダーゼ(天野製薬ラクターゼF, 比活性8.5 unit/mg)の水溶液(2mg/ml)を20ml加え、25℃で1時間攪拌下で固定化した。

(第2段) その後十分水洗し、冷蔵保存(5℃)した。 β ガラクトシダーゼの固定化量は反応残液の酵素濃度をローリー法で求め、反応前の酵素濃度の減少から算出した。

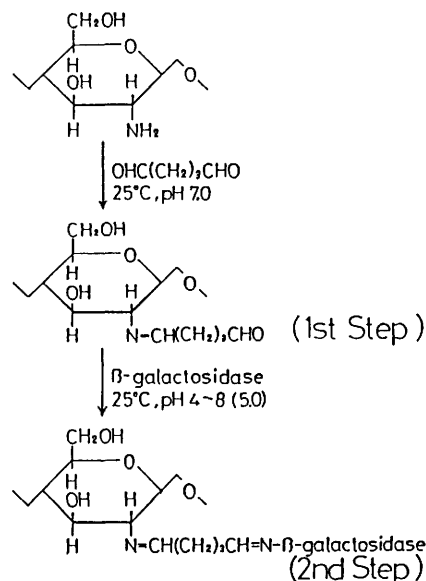


Fig.1 Immobilization scheme.

2.3 活性測定

測定は草桶らの方法[20]に準じた。所定量の遊離酵素または、固定化酵素（ビーズ）を1.5 mlの0.1M酢酸緩衝液（pH4.6）と2 mlの150 mMラクトース水溶液の混合液に加え、40℃で10分間反応し、その後ただちに沸騰水中で5分間加熱処理して酵素反応を停止した。このとき生成したグルコース量をグルコシュタット法[21]により求めた。但し、酵素活性の1 unitとは1分間あたりに1 μ mol のグルコースを生成する能力である。

2.4 走査電子顕微鏡観察

凍結乾燥したキトサンビーズに金蒸着し、その表面及び断面観察を日立S-510を用いて行った。

3. 結果と考察

表1に示す4種類のキトサンビーズを作製した。ビーズA及びDのSEM写真を図2に

Tab.1 Preparation of chitosan beads.

code	Dp	dope conc.	additive	coagulant
A	60	7 %	—	mixture of MeOH and aqu.NaOH
B	60	7 %	—	1.4% aqu.NH ₃
C	60	7 %	PEG	mixture of MeOH and aqu.NaOH
D	770	1.4%	—	mixture of MeOH and aqu.NaOH

示す。ビーズAの表面には約1.8 μ の網目組織が見られ、内部は中心部から放射状に多孔組織が形成されている。ビーズBの表面には多くのしわが見られたが、網目組織は形成しなかった。アンモニア水凝固液の場合、その蒸気によりドープを滴下する前に空気中で凝固し始め、ビーズ作製に適さなかった。ビーズCの添加剤（PEG 1000, 200phr）効果は大きくなく、ビーズAと比べて内部多孔構造はより粗く破損しやすくなったが、表面構造は同様の網目状であった。キトサン分子量（重合度）効果はドープ濃度と関連するが、ビーズDに見られるように分子量が増大すると表面組織は緻密になり、網目構造は形成しなくなる。断面構造はどのビーズでもほぼ同様で、ビーズDの断面写真から明らかなように内部多孔構造は均質でなく、中心部が最も粗くビーズ表面に近づくにつれて密になる。

これらのビーズを用いて β ガラクトシダーゼを固定化したときの固定化量、活性及び活性収率を表2に示す。

Tab.2 Amount of enzyme immobilized by chitosan beads, activity and its yield

code	bead size (mm)	Amount of enzyme immobilized * (mg)	Activity (units)*	Activity yield (%)*
A	2.3	12.5	12.5	3.7
B	2.7	9.7	11.6	3.4
C	2.3	11.9	12.2	3.6
D	2.3	9.8	11.9	3.5

* per 1 g (wet) beads

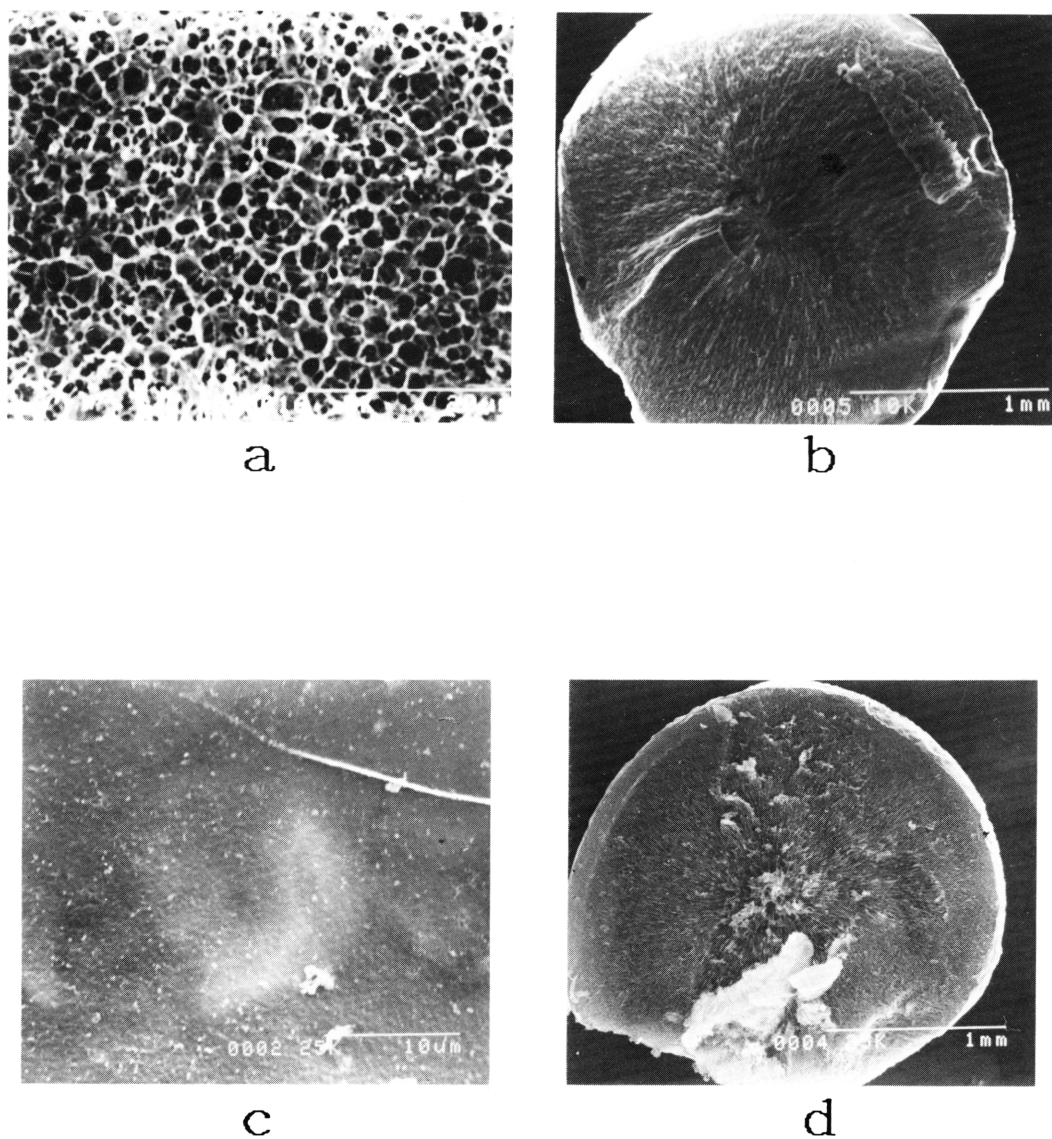


Fig.2 SEM photographs of chitosan beads A; a)surface, b)cross-section, and beads D; c)surface, d)cross-section.

網目状の表面構造を持つビーズAとCは、網目組織のないビーズBとDより固定化量が多く、活性及び活性収率もやや高い値を示した。以下の実験ではビーズAについて行った。

固定化反応 (pH 5) における β ガラクトシダーゼ濃度の影響を調べた結果を表3に示す。

Tab. 3 Effect of the amount of enzyme added on the immobilized β -galactosidase activity.

Added enzyme (mg)	enzyme activity (units)	Immobilized enzyme* (mg)	enzyme activity (units)	Activity yield (%)
10	85	5.7	9.4	11.0
20	170	6.3	11.4	6.7
40	340	12.5	12.5	3.7
60	510	19.4	14.9	2.9
80	680	25.3	15.3	2.3

* per 1 g (wet) beads A.

高濃度ほど固定化量は増大しそれに伴い固定化酵素の活性は増大したが、活性収率（加えた酵素の活性を100としたときの固定化酵素の活性）は逆に減少した。

次に加える酵素量を40mgに一定にしたときの固定化量に及ぼすpHの影響を調べた。結果を図3に示す。固定化量はpH5で最大を示した。この弱アルカリ性領域で固定化量が大いのはグルタルアルデヒドの反応性によるためである[19]。

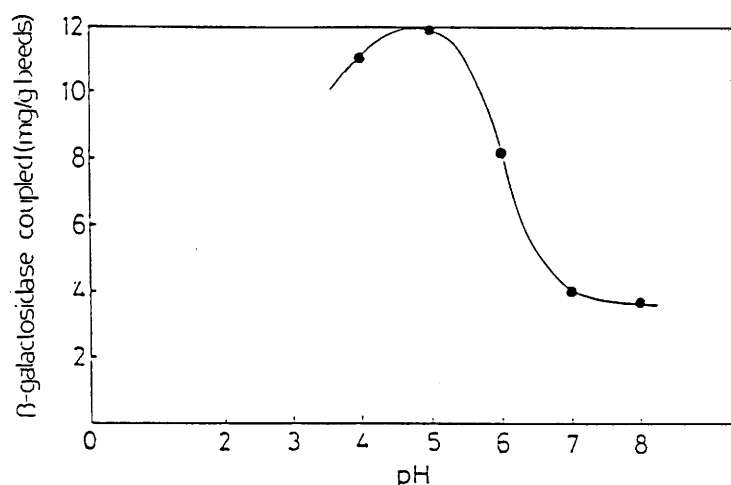


Fig. 3 Effect of pH on the amount of β -galactosidase coupled with chitosan beads A at 25°C for 1 hr. (40mg enzyme added)

以上の結果を基にビーズAを用いpH5, 加える β ガラクトシダーゼを40mgの反応条件下で固定化 β ガラクトシダーゼを作製し、その性質を調べた。

固定化 β ガラクトシダーゼの酵素活性のpH依存性を図4に示す。固定化酵素の至適pH4は遊離酵素のpH5より酸性側に移動した。このような現象はポリカチオン性担体に酵素固定化した場合によく見られるもので、固定化酵素の局所的な雰囲気のpHの変化によると説明されている[19,22]。

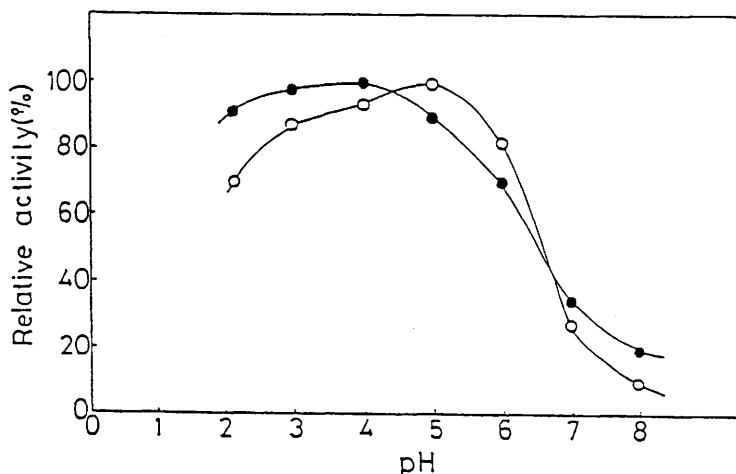


Fig.4 Effect of pH on the activity of β -galactosidase at 40 °C;
●:immobilized, ○:native.

固定化 β ガラクトシダーゼの酵素活性の温度依存性を図5に示す。固定化酵素の至適温度は55~60°Cで遊離酵素の50~55°Cより多少高温側に移動した。このような傾向は他の多くの固定化酵素でも認められている。

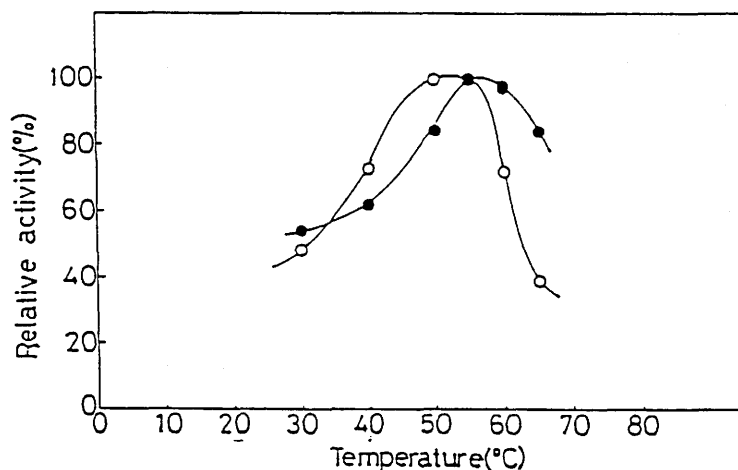


Fig.5 Effect of reaction temperature on the activity of β -galactosidase at pH4.6; ●:immobilized, ○:native.

固定化 β ガラクトシダーゼの熱安定性を図6に示す。測定はpH4.6の酢酸緩衝液1.5 ml

中、所定温度で30分間加熱後40℃（活性測定温度）にしてから基質溶液（150 mMラクトース水溶液）を2 ml加え、活性測定した。遊離酵素の活性がほとんど消失する60℃でも固定化酵素は65%の活性を保持していた。固定化により熱安定性は増大した。70℃以上では遊離及び固定化酵素共に活性を失った。

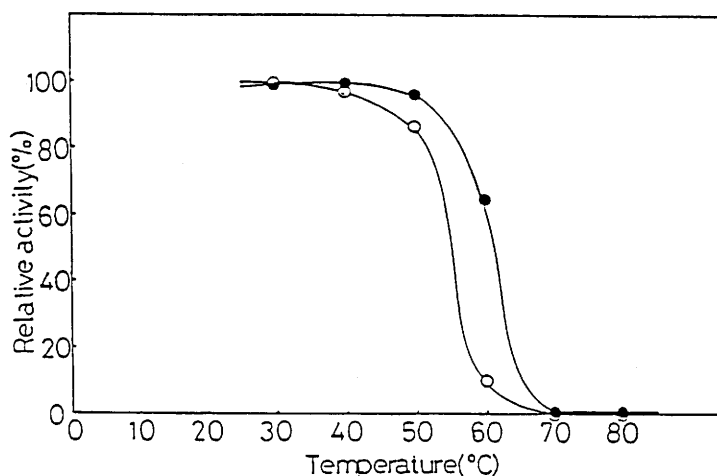


Fig.6 Thermostability of β -galactosidase; ●:immobilized, ○:native. Activity was determined at 40 °C and pH4.6 after incubation at each temperature for 30 min.

固定化酵素の反復使用に対する活性の安定性は、工業的利用にとり重要であり、多くの固定化酵素についてその安定性が調べられている。ここで作製した固定化 β ガラクトシダーゼを反復使用したときの活性変化を図7に示す。pH4.6，40℃で10分間反応後活性測定すると同時にキトサンビーズ（固定化 β ガラクトシダーゼ）を分別回収し、反復使用した

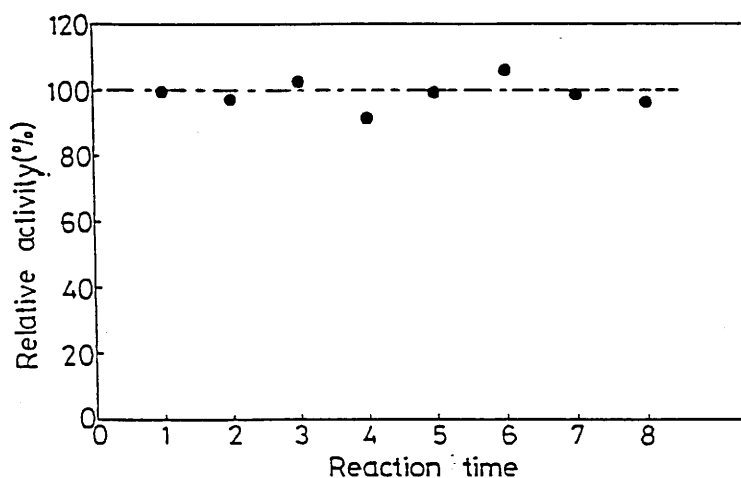


Fig.7 Effect of repeated use on the activity of β -galactosidase immobilized on chitosan beads A at 40 °C and pH4.6.

ときの活性変化を測定した。8回の反復使用に対し多少ばらつきはあるが低下することなく、ほぼ一定の活性を示した。このようにキトサンビーズを担体とする固定化 β ガラクトシダーゼは十分反復使用可能であることが認められた。

最後に、固定化 β ガラクトシダーゼの動力学定数を求めるため、ラクトース濃度〔S〕50mM～300mMの範囲で活性測定を行った。Lineweaver-Burk プロットを図8に示す。固定化酵素、遊離酵素共に直線性が得られ、Michaelis-Menten型の速度式[23]に対応していることが認められた。式(1)を適用してMichaelis 定数(K_m)と最大速度(V_{max})を求めた。結果を表4に示す。式(1)で v は $v=d(P)/dt$ の反応速度(酵素活性)である。

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (1)$$

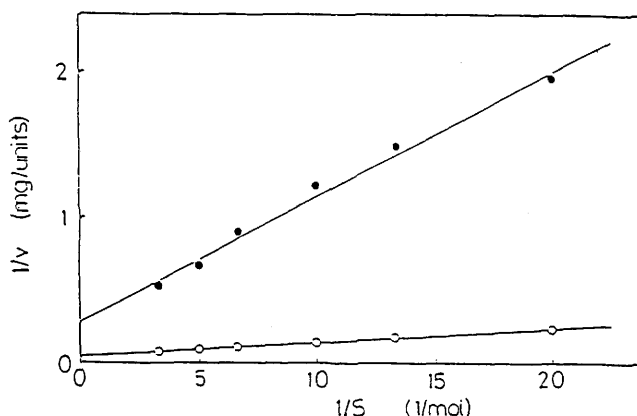


Fig.8 Lineweaver-Burk plots of β -galactosidase at 40°C and pH4.6;
●:immobilized, ○:native. (v :reaction rate, S :conc. of substrate)

固定化酵素の K_m 値は遊離酵素の1.6倍になり、酵素と基質の親和性がキトサンビーズに固定化することにより低下することを意味している。 K_m 値が高くなる傾向は、包括法による固定化酵素の場合によく見られる。一方、 V_{max} (理論的に求まる最大活性)は遊離酵素の約1/5となった。

Tab.4 Kinetic parameters for native and immobilized β -galactosidase.

	$K_m(\text{mol/l})$	$V_{max}(\text{units/mg})$
Native	0.174	17.8
Immobilized	0.278	3.3

4. 結 論

キトサンビーズの作製法と β ガラクトシダーゼの固定化担体としての性能及び固定化酵

素の性質について検討して次の結果を得た。

低重合度キトサン (Dp=60) の 7% キトサン/酢酸水溶液をドープとし、メタノール/水酸化ナトリウム水溶液 (5/95) の混合液を凝固液に用い、注射器でドープを凝固液に滴下してビーズを作製したとき、ビーズ表面には網目組織が形成し固定化担体として最も適したビーズができた。

固定化反応時の β ガラクトシダーゼの仕込量 (濃度) とともに固定化量は増大したが、活性収率は減少した。また、固定化反応は pH 5 で最大固定化量が得られた。

固定化 β ガラクトシダーゼの至適 pH は 4 で遊離酵素の pH 5 より酸性側に移動した。また、至適温度は 55~60°C で遊離酵素より 5°C 上昇した。

固定化 β ガラクトシダーゼの熱安定性は遊離酵素が失活する 60°C でも室温時の 65% の活性を維持し、熱安定性が増大した。

固定化 β ガラクトシダーゼの 8 回の反復使用において活性低下は生じなかった。

これらの結果より、ここで作製したキトサンビーズは酵素の固定化担体として有用であると考えられる。

謝 辞

本研究に対して多大なご助言を賜りました福井工業大学工学部の草桶秀夫氏並びに本学生物化学工学科の池田功夫氏に謝意を表します。また、酵素試料を提供下さいました天野製薬㈱に感謝申し上げます。

文 献

- 1) R.A.A. Muzzarelli, "Chitin", Pergamon Press (1977)
- 2) 栗田恵輔、「キチン、キトサンの化学とその応用」、化学の領域、35-12、9 (1981)
- 3) 戸倉清一、「キチン—化学修飾とその再生」、高分子加工、32、162 (1983)
- 4) J.P. Zikakis, "Chitin, Chitosan and Related Enzymes", Academic Press (1984)
- 5) 栗田恵輔、「キチンの化学修飾」、有機合成化学協会誌、42、567 (1984)
- 6) 平野茂博、「キチン・キトサン—古くて新しいバイオテクノロジー用素材」、繊維学誌、42、P-226 (1986)
- 7) 平野茂博、「キチン・キトサンの化学」、高分子加工、35、444 (1986)
- 8) 戸倉清一ら、第3回生体繊維と生医学材料に関するシンポジウム、p. 21-23、東京 (繊維学会主催 1986)
- 9) キチン・キトサン研究会編、「最後のバイオマス—キチン・キトサン」、技報堂 (1988)
- 10) K. Sakurai, J. Fujimoto, T. Shibano, T. Takahashi, 繊維学誌、39、T-493 (1983)
- 11) K. Sakurai, M. Takagi, T. Takahashi, 繊維学誌、40、T-246 (1984)
- 12) K. Sakurai, A. Minami, T. Takahashi, 繊維学誌、40、T-425 (1984)
- 13) K. Sakurai, T. Shibano, K. Kimura, T. Takahashi, 繊維学誌、41、T-361 (1985)
- 14) K. Sakurai, T. Shibano, T. Takahashi, 福井大工報、33、71 (1985)
- 15) K. Sakurai, T. Okumura, T. Takahashi, Rept. Pro. Polym. Phys. Japan, 28、641 (1985)

- 16) 桜井謙資、高橋利禎、 絨学誌, 44, 149 (1988)
- 17) K.Sakurai, K.Kobayashi, T.Takahashi, 絨学誌, 45, 22 (1989)
- 18) 桜井謙資、宮多應則、高橋利禎、 絨学誌, (投稿中)
- 19) 池田功夫、安藤春美、鈴木公宏、 絨学誌, 42, T-362 (1986)
- 20) H.Kusaoke, T.Nihei, H.Kusano, K.Kimura, 絨学誌, 44, 280 (1988)
- 21) R.E.Goodman, D.M.Pederson, Can.J.Microbiol., 22, 817 (1976)
- 22) 千畑一郎編、「固定化生体触媒」、p.138-145, 講談社 (1986)
- 23) 杉浦俊男、中谷純一、「化学概論」、p.267-269, 化学同人 (1987)
- 千畑一郎編、「固定化生体触媒」、p.308-, 講談社 (1986)